

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21860051

研究課題名（和文） 生体組織工学と血液学の融合による人工骨髄の創製

研究課題名（英文） a novel approach to create and characterize bone and bone marrow by the combination of tissue engineering and hematology

研究代表者

小原 洋志 (KOHARA HIROSHI)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：40528733

研究成果の概要（和文）：神経ペプチドの一種である Substance P (SP) をバイオマテリアルであるゼラチンハイドロゲルと組み合わせて徐放体を作製し、それをマウスへ移植することにより、移植7日後に効率よく血管新生が誘導されることを見出した。さらに移植部位の周囲には、腫瘍において血管新生を誘導することが知られる顆粒球が集積していた。徐放化 SP による血管新生の誘導は、血中よりの顆粒球の動員を介している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Angiogenesis was induced around the implanted site of gelatin hydrogels incorporating Substance P, a member of tachykinin family neuropeptides. In addition, accumulation of granulocytes, one of the circulating cells with angiogenic activities, around the implanted sites was observed. It is conceivable that the controlled release of SP efficiently induced the recruitment and the subsequent activation of granulocytes from the blood circulation into the site implanted, resulting in enhanced angiogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,080,000	324,000	1,404,000
2010年度	980,000	294,000	1,274,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,060,000	618,000	2,678,000

研究分野：生体組織工学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオマテリアル、ゼラチンハイドロゲル、徐放、神経ペプチド、血管新生、骨形成、加齢変化

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植療法は白血病・再生不良性貧血などの造血機能が障害される疾患の治療法として確立されている。そして細胞源には骨髄・末梢血・臍帯血の造血幹細胞が用いられている。しかし、ドナー不足や末梢血・

臍帯血中の造血幹細胞数の不足から、より高効率の移植法が求められている。皮下に人工骨髄を創製し細胞を直接移植することが移植の効率化に有効と考えられる。

2. 研究の目的

移植を効率化する人工骨髄の作製には血管新生の誘導、血管を介した細胞の動員、動員された細胞による骨髄様組織の形成の制御、形成された組織による造血幹細胞の移入・定着の促進、という段階を経ることが有用と考えられる。

そこで、血管新生の誘導に適した新規のバイオマテリアルを作製するため、血管新生誘導能をもつ神経ペプチド Substance P (SP) とゼラチンハイドロゲルを組み合わせた新規の徐放体を作製し、マウス体内へ移植することによりその効果を評価する。

3. 研究の方法

- (1) SP の徐放化に最適なゼラチンの電荷を検討するために、化学的にカチオン/アニオン基を導入することによって生理的条件下で正/負電荷をもつゼラチン(ゼラチン誘導体)よりハイドロゲルを作製し、そのゲルによる SP の徐放能を生体外で検討した。ゼラチン誘導体は、牛骨(IEP=5)または豚皮(IEP=9)由来ゼラチンとコハク酸(Succ), スペルミン(SM), あるいはエチレンジアミン(ED)を反応させることにより得た。ハイドロゲルはゼラチン誘導体を架橋剤グルタルアルデヒドにより化学架橋することで得た。放射性同位体標識した SP を種々のハイドロゲルに含浸させた後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中に静置し、ハイドロゲルの放射線量を経時的に測定することで、ハイドロゲルからの SP の徐放を評価した。
- (2) 体内での徐放化 SP の血管新生誘導能を評価するために、SP を含浸させたゼラチン誘導体ハイドロゲルをマウスの背部皮下に移植した。SP 徐放体により誘導された血管の密度を経時的に解析した。血管密度は、移植片周囲の写真の画像解析により、単位面積あたりの血管の長さ(線密度)として評価した。
- (3) 移植した SP 徐放体の周囲への細胞の集積を評価するため、移植 7 日後に移植片と周辺組織を摘出し、組織学的解析に処した。摘出した組織はメタノールにより固定したのち、顆粒球の特異的マーカーである Ly6G に対する蛍光標識抗体とともに一晩静置した。得られたサンプルは共焦点レーザー顕微鏡により観察した。
- (4) SP の顆粒球に対する活性を評価するため、生体外において細胞の走化性を評価するケモタキシスアッセイ、接着性を評価する接着アッセイ、および遺伝子発現を評価するリアルタイム PCR 解析を行

った。

4. 研究成果

- (1) コハク化ゼラチンや牛骨由来ゼラチンなどの負の電荷をもつゼラチンが、PBS 中で多くの SP を含浸した(図 1)。SP は生理的環境下において正の電荷をもつことから、SP が主に静電的相互作用によりゼラチン誘導体に保持されたと考えられる。この結果より、今後の実験には SP の徐放化に適したコハク化ゼラチンを用いることとした。

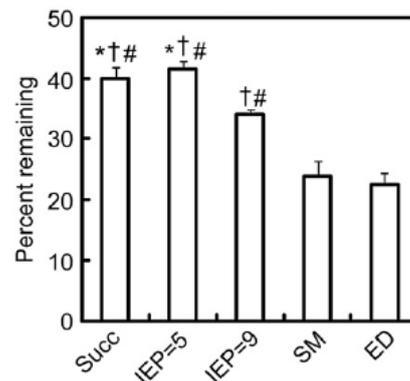


図 1 SP の徐放試験

- (2) 徐放化 SP を移植した群において、移植後 7 日目において等量の SP 水溶液を投与した群と比較して有意に血管密度が増加した。この結果より、SP をゼラチンハイドロゲルと組み合わせて徐放体を作製したことによって SP の活性を増強することができたと考えられる。(図 2)。

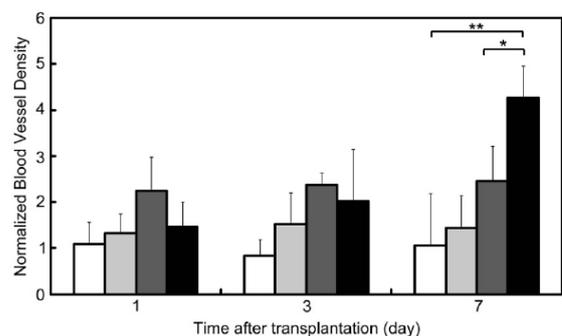


図 2 徐放体周囲の血管密度の経時変化

- SP を含まないゼラチンハイドロゲル
- SP 徐放体 (架橋剤 0.03%)
- SP 徐放体 (架橋剤 0.1%)
- SP 徐放体 (架橋剤 0.2%)

- (3) さらに、組織学的解析により、移植片の周囲には、末梢血中の細胞のうち腫瘍において血管新生を誘導することが知られる顆粒球が集積していることが示された(図3).

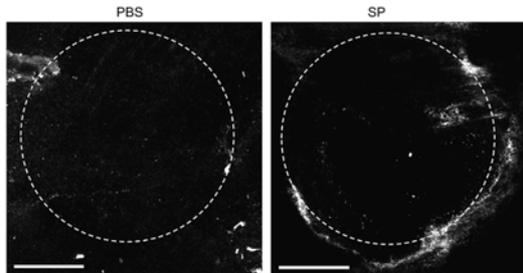


図3 移植片周囲の組織学的解析
白：顆粒球の特異的マーカーLy6G
破線：SP徐放体の移植部位
スケールバー：500 μ m

- (4) 生体外でのケモタキシスアッセイにより、顆粒球はSPに対して走化性を示すことが明らかとなった(図4). さらに、顆粒球の細胞外マトリックスであるフィブロネクチンへの接着が、SP刺激により亢進することが明らかとなった(図5). また、顆粒球からの血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)の発現量もSP刺激により増加した(図6). VEGFは、血管内皮細胞へ働き血管新生を促進する働きを持つ増殖因子の一種である.

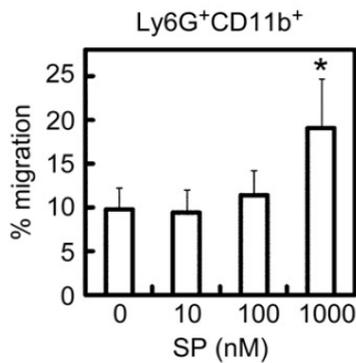


図4 末梢血中の顆粒球のケモタキシスアッセイ

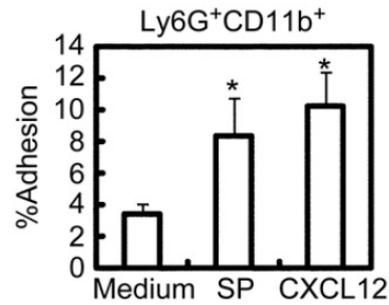


図5 末梢血の顆粒球の接着アッセイ

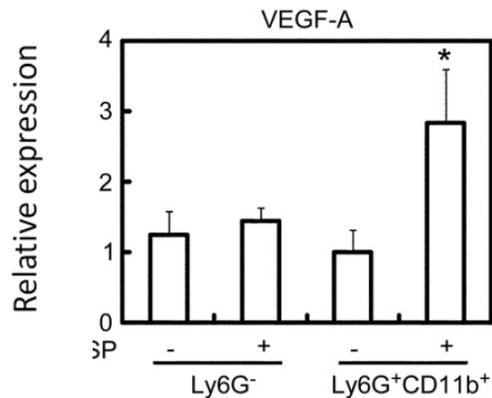


図6 末梢血の顆粒球におけるVEGFの発現

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① Kohara H, Tajima S, Yamamoto M, Tabata Y. Angiogenesis induced by controlled release of neuropeptide substance P、査読有、31 巻、2010、8617-8625

〔学会発表〕(計6件)

- ① Kohara, H., Yamamoto, M., Tabata, Y., The controlled release of neuropeptide induces angiogenesis、Biomedical Engineering Society 2010 Annual Meeting、2010.10.6-9、Austin Convention Center (米国テキサス州)
- ② 小原洋志、田畑泰彦、徐放化神経ペプチドによる血管新生の誘導、第31回日本炎症・再生医学会、2010.8.5-6、京王プラザホテル(東京都)
- ③ 小原洋志、田畑泰彦、ゼラチンハイドロゲルを用いた神経ペプチド徐放システム

による血管新生誘導、第 39 回医用高分子シンポジウム、2010. 7. 26-27、東京大学（東京都）

- ④ 小原 洋志、ゼラチンハイドロゲルを用いた神経ペプチドの徐放による血管新生誘導、第 31 回日本バイオマテリアル学会、2009. 11. 16、京都テルサ（京都府）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小原 洋志 (KOHARA HIROSHI)
京都大学・医学研究科・研究員
研究者番号：40528733